

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sintesis, dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.2. Alat Penelitian

4.2.1. Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling (Blender)
2. Pengayak mesh 20 dan 40
3. Timbangan analitik *balance Scout Pro*
4. Oven BINDER

4.2.2. Proses Ekstraksi

1. Timbangan analitik *balance Scout Pro*
2. Gelas ukur
3. Desikator
4. Cawan Porselen
5. Penyaring Buchner
6. Oven BINDER
7. Pipet tetes
8. Batang pengaduk
9. Sudip
10. Erlenmeyer
11. *Beaker glass*
12. *Rotary evaporator vacuum*

4.2.3. Pengujian Difusi Cakram

1. Inkubator
2. Autoklaf
3. Micro pipet
4. *Laminar Air Flow*
5. Tabung reaksi

6. *Hot plate*
7. Bunsen
8. Pipet volume
9. Kertas saring
10. Erlenmeyer
11. Penjepit
12. Cawan petri
13. Kawat ose
14. *Sterile blank discs*

4.2.4. Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. Cawan porselen
2. *Chamber*
3. Lempeng KLT
4. *Hot plate*
5. Vortex
6. Pinset
7. Pipa kapiler 5ul
8. Sinar UV
9. Timbangan analitik *balance Scout Pro 400 g*

4.3. Bahan Penelitian

4.3.1. Bahan Uji

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah *Limonia acidissima* L. yang didapatkan dari daerah Kecamatan Rasanae Barat, Kota Bima, NTB dan telah diidentifikasi oleh UPT. Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan, Jawa Timur. Mikroba uji adalah *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2. Proses Ekstraksi

1. Pelarut etil asetat teknis
2. Serbuk daging buah Kinca

4.3.3. Pengujian Difusi Cakram

1. Fraksi etil asetat daging buah *Limonia acidissima* L.
2. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
3. Aqudest steril
4. Nistatin
5. Jamur *Candida albicans*
6. DMSO 1 %

4.3.4. Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. N-Heksana teknis
2. Etil asetat teknis
3. Asam sulfat 10%
4. Larutan KOH 10%
5. FeCl_3 1%
6. Reagen Dragendorff
7. Reagen anisaldehyda-asam sulfat

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah komponen senyawa kimia pada fraksi etil asetat daging buah *Limonia acidissima* dengan konsentrasi fraksi sebesar: 25%, 30%, 35%.

4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji. Senyawa uji pada penelitian ini adalah senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat *Limonia acidissima* yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* yang ditandai dengan adanya daerah bening disekitar senyawa uji yang ada pada media agar sebagai parameter untuk menentukan diameter zona hambat (mm) senyawa dari fraksi etil asetat.

4.5. Definisi Operasional

Diagonal zona hambat adalah zona bening yang dihasilkan oleh aktivitas senyawa uji fraksi etil asetat buah *Limonia acidissima* L., dimana besarnya diagonal zona bening tersebut menandakan daya hambat dari aktivitas senyawa uji fraksi etil asetat buah *Limonia acidissima* L.

4.6. Penyiapan Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu dengan cara sterilisasi kering dan sterilisasi basah. Alat dan bahan yang akan disterilkan antara lain yaitu, cawan petri, erlenmeyer, penjepit, spatula, *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), dan alat serta bahan lain yang akan digunakan pada sterilisasi di autoklaf.

4.6.1. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas.

1. Sterilisasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung dan batang pengaduk.

2. Sterilisasi dengan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah mencapai suhu 160°C selama 1-2 jam.

4.6.2. Sterilisasi Basah

Sterilisasi basah dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, Erlenmeyer, dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15 – 20 menit.

4.7. Metode Penelitian

4.7.1. Rancangan Penelitian

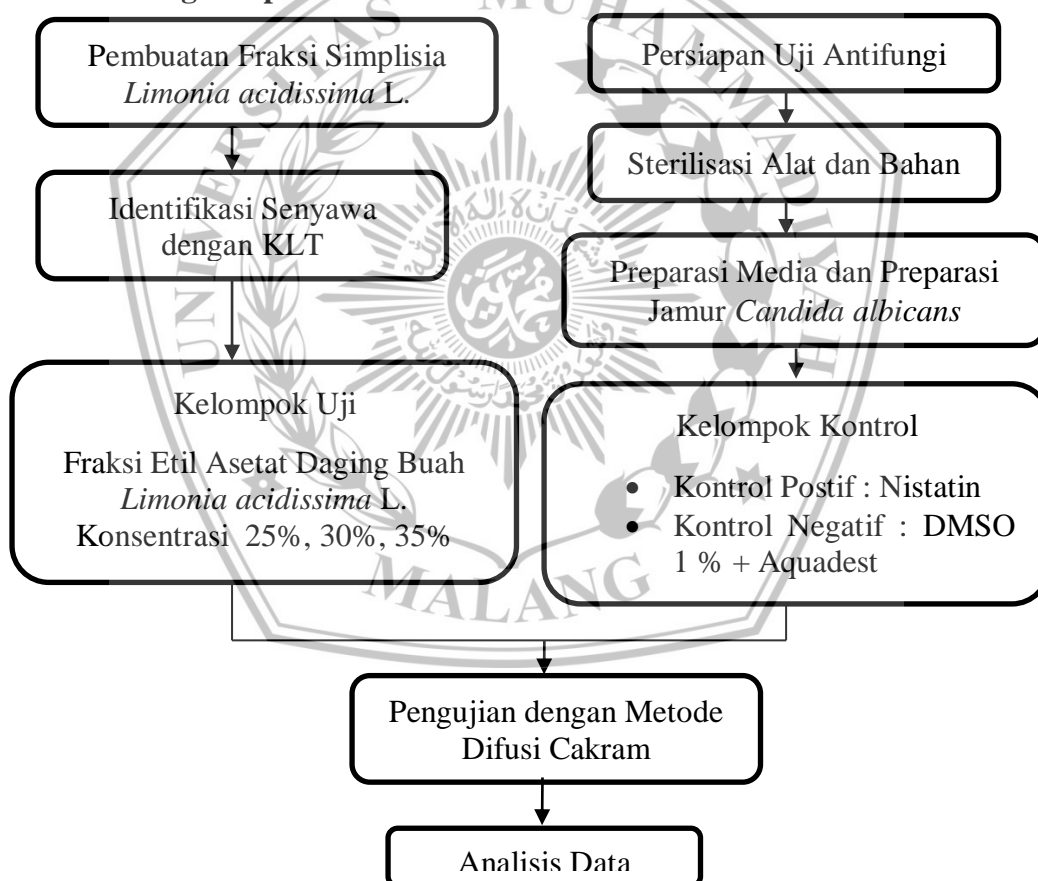
Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mendapatkan data diameter zona hambat senyawa dalam fraksi etil asetat daging buah *Limonia*

acidissima L. terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* serta mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat daging buah *Limonia acidissima* L. secara in vitro dengan metode difusi cakram.

Penelitian ini dilakukan dengan membagi bahan uji menjadi tiga konsentrasi ekstrak etil asetat, ditambah kontrol positif yaitu nistatin, dan kontrol negatif sebagai standarisasinya. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu:

1. Persiapan simplisia
2. Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antijamur dengan metode difusi cakram

4.7.2. Kerangka Operasional



Gambar 4.1. Skema Kerangka Operasional

4.8. Prosedur Kerja

4.8.1 Preparasi Simplisia

Sampel yang diuji aktifitas antijamurnya adalah daging buah *Limonia acidissima* L. Daging buah dicuci dengan air hingga bersih dan dilakukan pengeringan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggilingan, sehingga diperoleh serbuk halus. Selanjutnya diayak menggunakan *Shieve Shaker*.

4.8.2 Proses Fraksinasi Bahan Uji

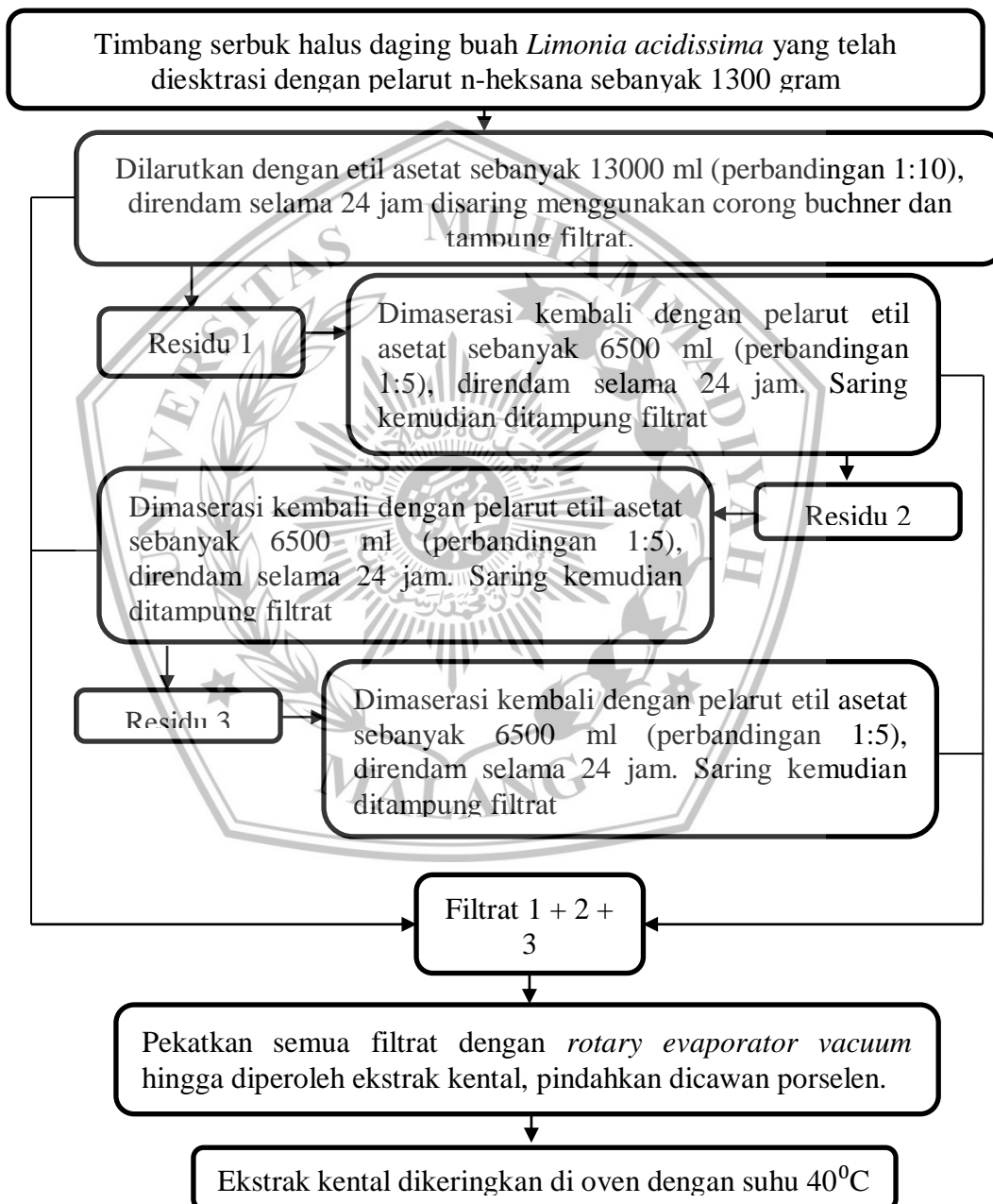
Pada proses fraksinasi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut yaitu pelarut N-Heksana, etil asetat dan etanol.

Dalam pembuatan fraksi digunakan serbuk daging buah *Limonia acidissima* yang telah diesktrasi dengan pelarut n-heksana sebanyak 1,3 kg dan kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan menggunakan metode maserasi (perendaman) selama 24 jam sebagai berikut :

1. Serbuk halus daging buah *Limonia acidissima* yang telah diesktrasi dengan pelarut n-heksana sebanyak 1300 gram, dimasukkan ke dalam sebuah bejana bermulut besar.
2. Tambahkan pelarut etil asetat sebanyak 13000 ml (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian saring dengan corong buchner didapatkan filtrat 1 dan residu 1.
3. Residu 1 dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat sebanyak 6500 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan ditampung filtrat 2 dan residu 2.
4. Residu 2 dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat sebanyak 6500 ml (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan ditampung filtrat 3 dan residu 3.
5. Proses maserasi dilakukan dengan cara yang sama dan berulang sampai filtrat tidak lagi menunjukkan adanya komponen yang tertarik dengan pelarut etil asetat yang ditandai dengan tidak adanya noda pada saat pengujian KLT dan

dilakukan penotolan KLT pada masing-masing filtrat sebanyak 5 μ l untuk melihat kepekatan dari filtrat.

6. Kemudian filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 50°C sampai didapatkan larutan ekstrak kental dan ekstrak kental dipindahkan ke cawan porselen.
7. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C sampai didapatkan bobot yang konstan dan disimpan pada lemari pendingin.



Gambar 4.2. Bagan Alur Proses Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daging Buah *Limonia acidissima* L.

- b. Timbang fraksi etil asetat daging buah *Limonia acidissima* L. sebanyak 300 mg, larutkan dalam 0,1 ml DMSO, ditambahkan aquadest steril sebanyak 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji 30% (b/v).
- c. Timbang fraksi etil asetat daging buah *Limonia acidissima* L. sebanyak 350mg, larutkan dalam 0,1 ml DMSO, ditambahkan aquadest steril sebanyak 1 ml, sehingga diperoleh larutan uji 35% (b/v).

4.8.6. Preparasi Media *Candida albicans*

Dalam penelitian ini digunakan satu media yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan dalam pembuatan suspensi mikroba menggunakan aquades steril dengan meremajakan jamur sehari sebelum penggunaan.

Media *Sabouraud Dextrose Agar* dibuat dengan melarutkan bahan SDA (*mycological peptone* 10 gram, glukosa 40 gram, dan agar 15 gram) sebanyak 65 gram kedalam 1 L aquades pada gelas ukur dengan kapasitas 1 L. Kemudian dipanaskan diatas *hot plate* sampai mendidih. Setelah itu, disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Dituang ke masing-masing cawan petri hingga membeku pada suhu kamar (Bridson, 2006).

Pada pembuatan media SDA untuk penelitian ini digunakan bahan SDA sebanyak 16,25 gram (*mycological peptone* 2,5 gram, glukosa 10 gram, dan agar 3,75 gram) yang kemudian dilarutkan dalam 250 ml aquades.

4.8.7. Identifikasi Jamur

Untuk pengujian aktivitas antijamur, dilakukan identifikasi dengan metode makroskopis dan mikroskopis. Kemudian pada uji makroskopis pengamatan dilakukan secara visual. Pada koloni *Candida albicans* yang terdapat pada media permukaan yang halus, berwarna putih kekuningan dan berbau ragi (Farizal dan Exchagusesa, 2017).

Pada uji mikroskopis digunakan pewarna *lactophenol cotton blue* (LPCB). Yang dilakukan dengan meneteskan alkohol 70% pada *object glass*, lalu ambil biakan jamur dengan jarum inokulasi yang telah disterilkan, dan letakkan pada *object glass* yang ditetesi alkohol. Kemudian tambahkan LPCB 1 atau 2 tetes, tutup dengan *cover glass*, dan lakukan pengamatan dengan mikroskop (Leck, 1999).

4.8.8. Preparasi Jamur *Candida albicans*

Pada peremajaan jamur *Candida albicans*, diambil satu ose dari biakan murni, lalu diinokulasi pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pada hasil peremajaan jamur diambil menggunakan jarum ose yang telah disterilkan, kemudian masukkan dalam tabung reaksi yang berisi 4 ml aquadest steril, dan divortex agar suspensi jamur homogen. Untuk melihat hasil kekeruhan suspensi jamur dapat dilakukan perbandingan dengan standar McFarland. Standar McFarland dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi sel dalam suspensi secara visual yang dinyatakan dalam CFU (*Colony Forming Unit*)/mL. (Sutton, 2011).

Tabel IV.1. Standar kekeruhan McFarland (Sutton, 2011)

Skala McFarland	CFU (10^8 /ml)	1% BaCl ₂ / 1%H ₂ SO ₄ (ml)
0,5	<300	0,05/9,95

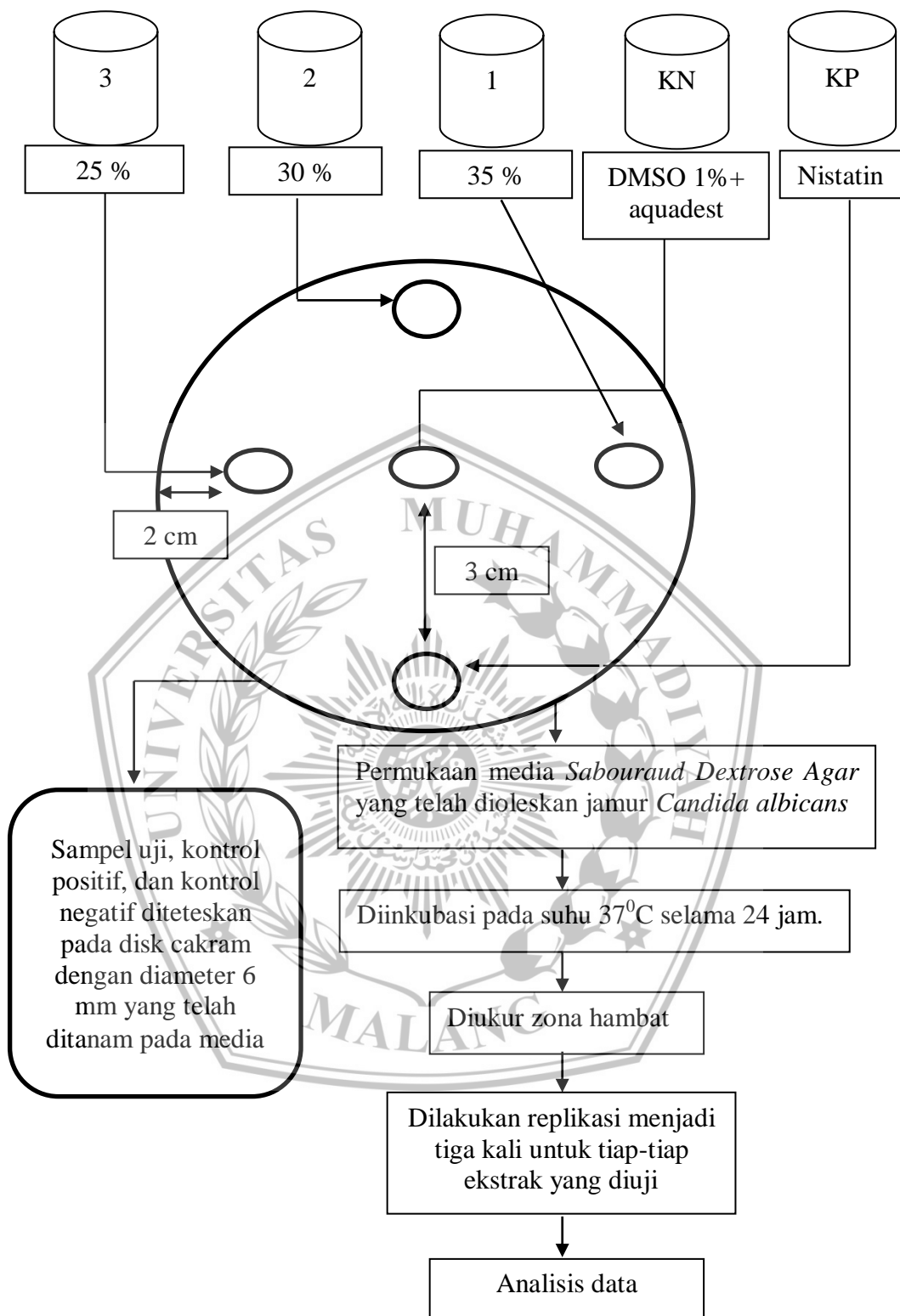
Untuk jamur *Candida albicans*, menggunakan standar McFarland 0,5 (tingkat kekeruhan 1×10^8 cfu/ml) (Sourmaghi, Gholamreza, dan Nasrin, 2006). Kemudian saat suspensi jamur kekeruhannya sama dengan standar McFarland yang dibuat, maka hasil yang didapatkan suspensi jamur dengan tingkat kekeruhan 10^8 cfu/ml. Apabila kekeruhan masih belum sama, dapat ditambahkan aquadest steril atau jamur *Candida albicans* lagi, hingga didapatkan kekeruhan yang sama.

Hasil dari tabung yang berisi suspensi jamur 10^8 cfu/ml, larutan diambil dengan *cotton bud* steril, sehingga untuk menghilangkan kelebihan cairan pada *cotton bud* steril putar beberapa kali dalam dinding tabung, kemudian inokulum dioles keseluruh permukaan media sebanyak 3 kali dengan memutar cawan dengan sudut 60° untuk setiap pengolesan. Lalu oleskan *cotton bud* steril ke sekeliling pinggiran permukaan agar. Biarkan inokulum mengering selama beberapa menit pada suhu ruang dengan cawan tertutup (WHO, 2009).

4.8.9. Pengujian Metode Difusi Cakram

Proses pengujian antijamur untuk metode difusi cakram, antara lain sebagai berikut :

1. Disiapkan vial yang telah berisi larutan uji dengan konsentrasi 10%; 15%; dan 20%.
2. Disiapkan preparasi jamur dalam media cair dengan volume total kurang dari 100 ml.
3. Jamur yang telah dipreparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu diletakkan pada tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar jamur yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu dioleskan pada *Sabouraud Dextrose Agar* dan diratakan.
4. Media *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah dioleskan jamur *Candida albicans* dibiarkan dahulu lima menit supaya mengering. Disk kertas saring dengan berdiameter 6 mm sebanyak 3 buah yang telah ditetesi sampel uji, kontrol positif (nistatin) dan kontrol negatif (DMSO 1%) 1 buah, kemudian diletakkan pada media pembenihan dengan jarak tiap cakram 3 cm dan dari tepi lempeng sebesar 2 cm. Disk kertas saring ditekan lembut dengan menggunakan pinset pada permukaan lempengan sehingga terdapat kontak yang baik antara disk lempengan agar. Jarak diatur sedemikian rupa sehingga satu disk dengan disk yang lainnya berjauhan.
5. Selanjutnya semua media *Sabouraud Dextrose Agar* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Pengujian senyawa antijamur dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya zona (area) jernih disekitar Disk kertas saring. Zona (area) hambatan yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan millimeter (mm).
7. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.



Gambar 4.3. Bagan Prosedur Pengujian Antijamur Dengan Metode Difusi Cakram

4.8.9. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat dari daerah berwarna bening dari masing-masing komponen senyawa yang telah dipisahkan pada fraksi etil asetat daging buah *Limonia acidissima* L.

